

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 287**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/24** (2006.01)

**C12M 1/38** (2006.01)

**C12Q 1/686** (2008.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01L 7/00** (2006.01)

**C12Q 1/6844** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2016 PCT/CN2016/081649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16180333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2016 E 16792183 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3296386**

54 Título: **Tubo de reacción de amplificación de ácido nucleico capaz de controlar la trayectoria de circulación de líquido**

30 Prioridad:

**12.05.2015 CN 201510237018**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.12.2020**

73 Titular/es:

**XIAMEN UNIVERSITY (50.0%)  
No. 422, Siming Nan Road Siming District  
Xiamen, Fujian 361005, CN y  
XIAMEN INNODX BIOTECH CO., LTD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GE, SHENGXIANG;  
ZHANG, SHIYIN;  
XU, FEIHAI;  
WANG, JIN;  
LI, JINJIE;  
ZHANG, JUN y  
XIA, NINGSHAO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 798 287 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Tubo de reacción de amplificación de ácido nucleico capaz de controlar la trayectoria de circulación de líquido

## 5 Campo técnico

La invención es en el campo de la biología molecular, particularmente en el campo de la amplificación de ácido nucleico. En particular, la invención se refiere a un tubo de reacción para amplificación de ácido nucleico, y más particularmente a un tubo de reacción para amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido. Además, la invención también se refiere a un método para amplificar ácido nucleico que comprende usar el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido de la invención. Además, la invención también se refiere a un aparato de reacción para la amplificación de ácido nucleico que comprende el tubo de reacción. Además, la invención también se refiere a un kit que comprende el tubo de reacción, y al uso del tubo de reacción en la preparación de un kit.

## 15 Antecedentes técnicos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una tecnología para amplificar rápidamente ADN *in vitro*, y cada ciclo incluye tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión. En primer lugar, una muestra de ADN bicatenario se calienta a una temperatura alta de aproximadamente 95 °C, y los enlaces de hidrógeno entre las cadenas dobles se rompen para que el ADN se separe en dos moléculas de ADN monocatenario complementarias, y se hace referencia a este proceso como una reacción de fusión a alta temperatura; luego, la temperatura se reduce rápidamente a aproximadamente 50-65 °C a la que el ADN monocatenario se une a un cebador de acuerdo con el principio del emparejamiento de bases complementaria, que se denomina reacción de hibridación a baja temperatura; después de la reacción de hibridación, la temperatura se eleva rápidamente a aproximadamente 72 °C para permitir la reacción de extensión, en la que se agregan secuencialmente nucleótidos individuales desde el extremo 3' del cebador mediante la ADN polimerasa a una concentración apropiada de iones de magnesio para formar un nuevo ADN. Después de dicho proceso, una molécula de ADN bicatenaria original se convierte en dos nuevas moléculas de ADN, y el número de moléculas de ADN se duplica. Después de cada ciclo, el número de moléculas de ácido nucleico objetivo se duplica, y estas moléculas bicatenarias recién formadas pueden usarse como plantillas para el siguiente ciclo. Después de 30 a 40 ciclos, el número de moléculas de ácido nucleico objetivo puede aumentar hasta casi 10<sup>9</sup> veces. La PCR es un método para obtener una gran cantidad de segmentos de ADN objetivo *in vitro*, para su posterior análisis y detección. En la actualidad, los dispositivos de reacción para PCR emplean principalmente bloques de metal con temperatura controlada para calentar tubos de reacción PCR hechos de plástico, y al calentar y enfriar los bloques de metal a la temperatura de equilibrio, el calor se transfiere desde el tubo de reacción a la solución de reacción PCR. La desventaja de este dispositivo es que: el volumen de reacción es grande, es decir, el dispositivo generalmente tiene un gran volumen y capacidad calorífica. Por lo general, se requieren 2-3 horas para completar una PCR convencional con 30 ciclos, y la mayor parte del tiempo se consume mediante el proceso de calentamiento y enfriamiento, es decir, haciendo que el bloque metálico alcance la temperatura de equilibrio y transfiera calor del tubo de reacción a la solución de reacción PCR, por lo tanto, la PCR rápida y eficiente es difícil de lograr.

En 2002, Madhavi Krishnan et al., (Krishnan M, Ugaz VM, Burns M A. PCR in a Rayleigh-Bénard convection cell. Science, 2002, 298 (5594): 793) informaron un método llamado PCR de Rayleigh-Benard (RB-PCR), basado en el principio de conducción de calor y convección térmica, utilizando dos fuentes de calor de temperatura constante dispuestas en las regiones superior e inferior, respectivamente, para establecer una cavidad de reacción cerrada que tiene un gradiente de temperatura de abajo hacia arriba y, por lo tanto, ocurre espontáneamente un movimiento de convección de los reactivos PCR, y hace que los reactivos de PCR fluyan repetidamente a través de regiones con diferentes temperaturas, para completar la amplificación. La velocidad de amplificación de este método es rápida, y el instrumento es mucho más simple que los instrumentos tradicionales de PCR, pero el reactivo de amplificación debe llenar toda la cavidad cerrada, lo que hace difícil cargar la muestra y conlleva a problemas tales como fugas y contaminación.

Chou et al., (Pin CW, Hei CP, Ming MJ, et al., Rapid DNA amplification in a capillary tube by natural convection with a single isothermal heater. BioTechniques, 2011, 50 (1): 52-57) en la Universidad de Taiwán realizó mejoras con base en la tecnología RB-PCR, cambiando la cavidad de reacción cerrada a un tubo de reacción abierto con especificación particular, y empleando una sola fuente de calor de temperatura constante para calentar el fondo del tubo para impulsar la circulación espontánea de reactivos dentro del tubo para completar la amplificación. Este método resuelve el problema de fugas y contaminación de RB-PCR.

Sin embargo, existen defectos comunes en los métodos de amplificación actuales basados en PCR de convección, es decir, la trayectoria de flujo del líquido en el tubo es complicada. La trayectoria de flujo en el tubo es una trayectoria de flujo multicapa casi en forma de elipses concéntricas (Figura 1a). Esta trayectoria compleja de flujo multicapa tiene los siguientes problemas de amplificación:

65 1. Baja eficiencia de amplificación:

(a) Eficiencia de desnaturalización: como se muestra en la Figura 1a, la desnaturalización efectiva de plantillas o amplicones puede ocurrir cuando las plantillas o amplicones pasan a través de la región D1 en la que la temperatura no es inferior a la temperatura de desnaturalización requerida por la plantilla o amplicón; mientras que la reacción de desnaturalización efectiva no puede ocurrir cuando las plantillas o amplicones pasan a través de la región D2 que se encuentra más alta que la región D1, lo que resulta en una baja eficiencia de degeneración general;

(b) Eficiencia de hibridación: como se muestra en la Figura 1a, puede producirse una reacción de hibridación efectiva cuando las plantillas y los cebadores monocatenarios pasan a través de la región A1 en la que la temperatura no es más alta que la temperatura de hibridación requerida por las plantillas y los cebadores; mientras que la reacción de hibridación efectiva no puede ocurrir cuando las plantillas y cebadores monocatenarios pasan a través de la región A2, que se encuentra más baja que la región A1, lo que resulta en una baja eficiencia de hibridación general.

2. Pobre especificidad de amplificación:

En la PCR de convección, debido a la falta de un área y un período de tiempo para la hibridación con una temperatura constante, la temperatura del extremo superior del tubo de reacción generalmente se controla para que sea más baja que la temperatura de hibridación de los cebadores controlando el campo de temperatura y el campo de flujo, para asegurar una hibridación suficiente de cebadores. Sin embargo, cuando las plantillas y (o) cebadores monocatenarios pasan a través de una región en la que la temperatura es demasiado baja en circulación, la especificidad de la reacción de hibridación se reduce y el emparejamiento no específico dentro de un cebador o entre dos cebadores, o entre el cebador y la plantilla (o amplicón) se pueden formar fácilmente, y cuando comienza la reacción de extensión, se forma un producto de amplificación no específico.

3. Pueden existir diferencias entre las reacciones de amplificación paralelas en los tubos respectivos:

(a) En cuanto a la detección cualitativa en el punto final de la reacción, los resultados muestran principalmente las diferencias en la eficiencia de amplificación y la constitución del producto: después de la desnaturalización, los productos de amplificación no específicos como se describe en el punto 2 mencionado anteriormente se convertirán en la plantilla en la siguiente ronda de amplificación no específica, de modo que la amplificación no específica se amplía continuamente y competirá por la disponibilidad de cebadores, enzimas, dNTP y otros componentes de reacción con la amplificación correcta, lo que resulta en la inhibición de la amplificación correcta y la reducción de la eficiencia de la reacción. Sin embargo, no se sabe si se produce o no esta reacción no específica, y si la tasa de ocurrencia de esta reacción no está controlada, es decir, hay una cierta aleatoriedad, lo que causará inconsistencia en términos de las eficiencias de amplificación entre los tubos de reacción en los que se produce una amplificación no específica. En los tubos de reacción en los que ocurre la amplificación no específica en un punto de tiempo anterior o tienen una mayor tasa de ocurrencia, la eficiencia de la reacción será menor que la de los tubos de reacción en los que la amplificación no específica ocurre en un momento posterior o tiene una menor tasa de ocurrencia. Y en los dos tubos de reacción mencionados anteriormente, las eficiencias de reacción son ambas más bajas que las de los tubos de reacción en los que no se ha producido la amplificación no específica. Del mismo modo, hay una alta proporción de productos no específicos en los tubos de reacción en los que ocurre la amplificación no específica en un punto de tiempo anterior o tiene una mayor tasa de ocurrencia, y hay una baja proporción de productos no específicos en los tubos de reacción en los que ocurre la amplificación no específica en un punto de tiempo posterior o tiene una tasa menor de ocurrencia, mientras que en los tubos de reacción en los que no se produce amplificación no específica, los productos en el tubo son todos productos de amplificación correctos.

(b) En cuanto a la detección cuantitativa en tiempo real, los resultados muestran principalmente las diferencias en la eficiencia de amplificación por unidad de tiempo: es decir, la detección cuantitativa en tiempo real no puede realizarse. Como se describió anteriormente en los puntos 1 y 2, cuando comienza la reacción PCR de convección, no se sabe si la plantilla bicatenaria puede pasar a través de la región efectiva para la desnaturalización, o si la plantilla y el cebador monocatenarios pueden pasar a través de la región efectiva para la hibridación, y si se produce una reacción no específica durante la reacción de hibridación. Por lo tanto, al comienzo de la reacción, se pueden generar diferencias en la constitución del producto entre diferentes tubos. Estas diferencias no solo pueden conducir a problemas descritos en el apartado 3(a) anterior, sino también a diferencias en la cantidad de productos (plantillas) en diferentes tubos de reacción por unidad de tiempo, y dar lugar a diferencias en el punto de tiempo cuando se entra en la fase exponencial de amplificación, por lo tanto, la cuantificación de plantillas no se puede realizar mediante el método tradicional de monitoreo en tiempo real.

Contenido de la invención

Es un objetivo de la invención proporcionar un tubo de reacción novedoso para la amplificación de ácido nucleico y un método para la amplificación de ácido nucleico, para resolver los problemas en la PCR de convección actual, tal como baja eficiencia de amplificación, menos especificidad, gran diferencia entre los tubos de reacción y cuantificación imprecisa.

Un primer aspecto de la invención proporciona un tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico que comprende un cuerpo de tubo con un extremo cerrado, dicho cuerpo de tubo comprende una región de depósito y una

- región de amplificación de ácido nucleico ubicada debajo de la región de depósito, en el que está dispuesto un inserto en dicha región de amplificación de ácido nucleico con un espacio superior que permanece por encima del inserto y un espacio inferior que permanece por debajo del inserto. Cuando se inyecta un reactivo en el tubo de reacción, el reactivo es capaz de moverse a lo largo de una trayectoria de circulación a través del espacio superior y el espacio inferior en el tubo de reacción bajo una fuerza interna o externa, debido a un efecto físico de barrera del inserto.
- Preferiblemente, el inserto se proporciona a lo largo del eje central del cuerpo del tubo, y ambos lados del inserto están conectados a la pared interna de la región de amplificación de ácido nucleico. El inserto divide la región de amplificación de ácido nucleico en una primera región y una segunda región a lo largo del eje central del cuerpo del tubo, y la primera región y la segunda región están conectadas a través de una región superior y una región inferior de la región de amplificación de ácido nucleico.
- Preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior del inserto y la parte inferior del cuerpo del tubo es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que la mitad de la altura de la región de amplificación del ácido nucleico. Más preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior del inserto y la parte inferior del cuerpo del tubo (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que 1/3 de la altura de la región de amplificación de ácido nucleico. Más preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior del inserto y la parte inferior del cuerpo del tubo es mayor de 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor o igual a 4 mm.
- Preferiblemente, la distancia entre el extremo superior del inserto y la parte superior de la región de amplificación de ácido nucleico es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que la mitad de la altura de la región de amplificación de ácido nucleico. Más preferiblemente, la distancia entre el extremo superior del inserto y la parte superior de la región de amplificación de ácido nucleico es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que 1/3 de la altura de la zona de amplificación del ácido nucleico. Más preferiblemente, la distancia entre el extremo superior del inserto y la parte superior de la región de amplificación de ácido nucleico es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor o igual a 3 mm.
- Preferiblemente, el fondo del cuerpo del tubo se cierra por medio de un tapón inferior que coopera con el cuerpo del tubo. Preferiblemente, el cuerpo del tubo y el tapón inferior están conectados herméticamente entre sí mediante una estructura roscada giratoria, o una estructura de bayoneta en forma de anillo, o una estructura de cierre de golpe, o mediante otra conexión hermética como se conoce en la técnica.
- Preferiblemente, el cuerpo del tubo comprende además una cubierta de tubo que coopera con el mismo. Preferiblemente, el cuerpo del tubo y la cubierta del tubo están conectados herméticamente entre sí mediante una estructura roscada giratoria, o una estructura de bayoneta en forma de anillo, o una estructura de cierre de golpe, o mediante otra conexión hermética como se conoce en la técnica.
- Preferiblemente, la región de amplificación de ácido nucleico tiene una relación de altura/diámetro interno de 3 a 12. Más preferiblemente, la región de amplificación de ácido nucleico tiene una relación de altura/diámetro interno de 6 a 9.
- Preferiblemente, la región de amplificación de ácido nucleico tiene un volumen de 30 a 200  $\mu\text{L}$ . Más preferiblemente, la región de amplificación de ácido nucleico tiene un volumen de 40 a 150  $\mu\text{L}$ .
- Preferiblemente, el cuerpo del tubo y el inserto están hechos de un material resistente al calor. Por ejemplo, el material resistente al calor se selecciona de vidrio, policarbonato, polipropileno, polietersulfona y polisulfona.
- Además, se prefiere que la pared interna del cuerpo del tubo pueda pasivarse con albúmina de suero bovino (BSA) o un agente de sililación, etc., reduciendo así la adsorción de ácido nucleico y ciertos componentes en el reactivo.
- En una realización preferida, la cavidad interna de la región de amplificación de ácido nucleico tiene una estructura hueca en columna que tiene diámetros internos superior e inferior iguales, o tiene una estructura hueca cónica o una estructura hueca trapezoidal multicapa, que tiene una sección transversal con parte superior ancha y parte inferior estrecha. La amplificación de ácido nucleico, la transcripción de ARN y la adquisición de señal en la detección en tiempo real se realizan en esta región.
- En otra realización preferida, la región de amplificación de ácido nucleico puede proporcionarse con una marcación de escala de volumen visible.
- Otro aspecto de la invención proporciona un aparato de reacción para la amplificación de ácido nucleico que comprende el tubo de reacción de acuerdo con uno cualquiera del primer aspecto de la invención y uno o más controladores de temperatura capaces de proporcionar o eliminar calor, dicho controlador de temperatura está dispuesto fuera o dentro del tubo de reacción.
- Aún otro aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende el tubo de reacción de acuerdo con uno cualquiera del primer aspecto de la invención.

Todavía otro aspecto de la invención proporciona un método para amplificar un ácido nucleico objetivo en una muestra, que comprende usar el tubo de reacción de acuerdo con uno cualquiera del primer aspecto de la invención o el aparato de reacción para la amplificación de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de la invención.

5 Preferiblemente, el ácido nucleico es ADN o ARN.

Preferiblemente, la amplificación es una reacción PCR o una reacción de transcripción inversa.

Preferiblemente, el método comprende los etapas de:

- 10
- 1) inyectar un reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico en el tubo de reacción de acuerdo con uno cualquiera del primer aspecto de la invención;
  - 2) llenar el reactivo en la región de amplificación de ácido nucleico mediante vibración, centrifugación u otras formas; opcionalmente, cubriendo la superficie del reactivo con una sustancia no volátil (por ejemplo, aceite de parafina o cera de bajo punto de fusión) o cerrando el tubo de reacción con una cubierta para tubo;
  - 15 3) proporcionar o eliminar calor en un sitio específico del tubo de reacción mediante un controlador de temperatura para completar la transcripción inversa de ARN y/o la reacción de amplificación de ADN;
  - 4) opcionalmente, detectar el producto amplificado durante o después de la amplificación de ácido nucleico.

20 La invención también proporciona el uso del tubo de reacción de acuerdo con uno cualquiera del primer aspecto de la invención o el aparato de reacción para la amplificación de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de la invención en la amplificación de ácido nucleico.

25 La invención también proporciona el uso del tubo de reacción de acuerdo con uno cualquiera del primer aspecto de la invención en la preparación de un kit, y el kit se usa para la amplificación de ácido nucleico.

Efecto beneficioso de la invención

30 En la invención, debido a un efecto físico de barrera del inserto, el reactivo en el tubo solo puede pasar por debajo y por encima del inserto en el movimiento impulsado por una fuerza externa o fuerza interna; y a través de uno o más controladores de temperatura dispuestos fuera o dentro del tubo de reacción, se puede calentar una región específica en el tubo de reacción. De esta manera, la reacción de desnaturalización puede ocurrir cuando el reactivo en circulación pasa a través de cierta región debajo del inserto, y la reacción de hibridación puede ocurrir cuando el reactivo en circulación pasa a través de una región por encima del inserto. Dicha trayectoria de circulación y el modo de control de temperatura pueden lograr los siguientes beneficios:

35 1. Mejora de la eficiencia de amplificación: (a) mejora de la eficiencia de desnaturalización: como se muestra en la Figura 1b, debido al efecto físico de barrera del inserto 2, cuando el reactivo en circulación se mueve al extremo inferior del tubo de reacción, solo puede pasar a través de la región D1 debajo del inserto 2, y por medio del controlador de temperatura, la región puede mantenerse a una temperatura superior a la temperatura requerida para la reacción de desnaturalización. Por lo tanto, puede producirse una reacción de desnaturalización efectiva cuando el reactivo en circulación pasa a través de la región D1 debajo del inserto 2 del tubo de reacción; (b) mejorar la eficiencia de hibridación: como se muestra en la Figura 1b, debido al efecto físico de barrera del inserto 2, cuando el reactivo en circulación se mueve al extremo superior del tubo de reacción, solo puede pasar a través de la región A1 por encima del inserto 2, y por medio del controlador de temperatura, la región puede mantenerse a una temperatura deseada para la hibridación de un cebador específico. Por lo tanto, puede producirse una reacción de hibridación efectiva cuando el reactivo en circulación pasa sobre el inserto 2 del tubo de reacción.

50 2. Asegurar la especificidad de amplificación: como se muestra en la Figura 1b, debido al efecto físico de barrera del inserto 2, cuando el reactivo en circulación se mueve al extremo superior del tubo de reacción, solo puede pasar a través de la región A1 por encima del inserto 2, y por medio del controlador de temperatura, la región se puede mantener a una temperatura deseada para la hibridación de un cebador específico sin estar muy por debajo de la temperatura de hibridación del cebador específico. Por lo tanto, cuando el reactivo en circulación pasa a través de la región, no puede producirse un emparejamiento no específico dentro de un cebador o entre dos cebadores, o entre el cebador y la plantilla (o amplicón), lo que resulta en una amplificación no específica.

3. Mejora de la consistencia entre las amplificaciones en diferentes tubos:

60 (a) Mejora de la consistencia entre amplificaciones en diferentes tubos al aumentar la especificidad: como se describe en el punto 2 mencionado anteriormente, ya que la formación aleatoria de un producto no específico que competirá por cebadores, enzimas, dNTP y otros componentes de reacción no ocurrirá la amplificación correcta, la eficiencia de la amplificación correcta no se vería afectada por la amplificación no específica, y por lo tanto la consistencia entre amplificaciones en diferentes tubos por unidad de tiempo puede mejorarse; (b) Mejora de la consistencia entre las amplificaciones en diferentes tubos al aumentar la eficiencia de amplificación: cuando comienza la PCR de convección, debido al efecto físico de barrera del inserto 2 en el tubo de reacción y la función de control por el controlador de temperatura, todas las plantillas bicatenarias en el tubo pueden pasar a través de la región para una desnaturalización

efectiva y experimentar una reacción de desnaturalización; y cuando el reactivo en circulación se mueve hacia el extremo superior del tubo de reacción, todas las plantillas y cebadores monocatenarios pueden pasar a través de la región para la hibridación y experimentar una reacción de hibridación. Por lo tanto, el ciclo no válido debido a la trayectoria de circulación en tándem (por ejemplo, cuando el reactivo en circulación se mueve a la posición inferior, no pasa a través de la región a la temperatura deseada para la desnaturalización, y (/o) cuando el reactivo en circulación se mueve a la posición superior, no pasa a través de la región a una temperatura deseada para la hibridación) no se producirá, a fin de mejorar la consistencia entre amplificaciones en diferentes tubos por unidad de tiempo. (c) debido a la consistencia mejorada entre amplificaciones, la consistencia de los productos amplificados en el punto final entre reacciones paralelas se puede mejorar, y por lo tanto la consistencia entre amplificaciones por unidad de tiempo en reacciones paralelas también se puede mejorar. Por lo tanto, la cuantificación de las plantillas iniciales en amplificación por PCR de convección se puede realizar mediante detección de fluorescencia en tiempo real.

Las realizaciones de la invención se describirán en detalle con referencia a los dibujos y ejemplos que se acompañan. Sin embargo, los expertos en la materia entenderán que los siguientes dibujos y ejemplos están destinados a ser ilustrativos de la invención únicamente y no están destinados a limitar el alcance de la invención. Varios objetivos y aspectos ventajosos de la invención son evidentes para los expertos en la técnica, de acuerdo con la siguiente descripción detallada de los dibujos y realizaciones preferidas.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a muestra una trayectoria de circulación en un estado de convección natural;

La Figura 1b muestra una trayectoria de circulación de líquido controlada por el tubo de reacción de la invención;

La Figura 2a es una vista frontal de un tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido;

La Figura 2b es una vista lateral del tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido;

La Figura 2c es una vista frontal en despiece ordenado del tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido;

La Figura 2d es una vista superior del tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido;

La Figura 3 muestra un diagrama que ilustra un dispositivo para calentamiento y detección de fluorescencia de un tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido;

La Figura 4 muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos a partir de plantillas de ADN usando el tubo de reacción de la invención;

La Figura 5 muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos a partir de plantillas de ARN utilizando el tubo de reacción de la invención;

La Figura 6a muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos mediante el uso del tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido;

La Figura 6b muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos usando el tubo de reacción sin la función de control de circulación;

La Figura 7a muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos usando el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido para diferentes tiempos de amplificación;

La Figura 7b muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos usando el tubo de reacción sin la función de control de circulación para diferentes tiempos de amplificación;

La Figura 8a muestra los resultados de la detección de fluorescencia en tiempo real de la amplificación de ácido nucleico en el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido;

La Figura 8b muestra resultados de detección de fluorescencia en tiempo real de amplificación de ácido nucleico en el tubo de reacción sin la función de control de circulación.

#### Modos específicos para llevar a cabo la invención

En la invención, los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que los expertos en la materia entienden comúnmente, a menos que se especifique lo contrario. Además, los procedimientos de laboratorio de genética molecular, química de ácidos nucleicos e inmunológicos utilizados en el presente documento son los procedimientos de rutina que se utilizan ampliamente en los campos correspondientes. Mientras tanto, con el fin de comprender mejor la invención, a continuación se proporcionan definiciones y explicaciones de términos relacionados.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificación" debe entenderse en un sentido amplio, que comprende cualquier proceso de preparación de ADN a partir de ARN o ADN, que incluye, pero no se limita a, reacción PCR, reacción de transcripción inversa y diversas variaciones de las mismas (por ejemplo, reacción PCR en tiempo real).

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" incluye ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN).

La Figura 1a muestra una trayectoria de movimiento de la circulación en el tubo de reacción en un estado de convección natural. La convección puede ocurrir si se desarrolla una diferencia de temperatura en una sección específica dentro del tubo de reacción. Por lo tanto, en el espacio del tubo de reacción, la trayectoria de circulación no es única, sino que presenta una característica multicapa y multidireccional. Luego, en esta circulación de múltiples capas, (1) las plantillas o amplicones pueden experimentar una reacción de desnaturalización efectiva cuando pasan a través de la región D1 en la que la temperatura no es inferior a la temperatura requerida para la desnaturalización; mientras que las plantillas o amplicones no pueden experimentar una reacción de desnaturalización efectiva cuando pasan a través de la región D2 ubicada por encima de la región D1, lo que resulta en una baja eficiencia de desnaturalización general; (2) las plantillas y cebadores monocatenarios pueden experimentar una reacción de hibridación efectiva cuando pasan a través de la región A1 en la que la temperatura no es más alta que la temperatura requerida para la hibridación; mientras que las plantillas monocatenarias y los amplicones no pueden experimentar una reacción de hibridación efectiva al pasar por la región A2 ubicada debajo de la región A1, lo que resulta en una baja eficiencia de hibridación general; (3) cuando las plantillas y (o) cebadores monocatenarios pasan a través de una región en la que la temperatura es demasiado baja en la circulación, se reduce la especificidad de la hibridación y el emparejamiento no específico dentro de un cebador o entre dos cebadores, o entre el cebador y la plantilla (o amplicón) se puede formar fácilmente, y cuando comienza la reacción de extensión, se forma un producto de amplificación no específico; (4) después de la desnaturalización, el producto amplificado no específico se convierte en la plantilla para la próxima ronda de amplificación no específica, de modo que la amplificación no específica se amplía continuamente y compite por la disponibilidad de cebadores, enzimas, dNTP y otros componentes de reacción con amplificación correcta, lo que resulta en la inhibición de la amplificación correcta y la reducción de la eficiencia de la reacción. Sin embargo, no se sabe si esta reacción no específica se produce o no, y si la tasa de ocurrencia de esta reacción no está controlada, es decir, hay una cierta aleatoriedad, lo que conducirá a la inconsistencia de las eficiencias de amplificación entre los tubos de reacción en los que se produce dicha amplificación no específica; (5) dicha inconsistencia de amplificación aparecerá como una diferencia en la eficiencia de amplificación efectiva por unidad de tiempo en la detección cuantitativa en tiempo real, lo que conduce a la incapacidad de cuantificar las plantillas de ácido nucleico utilizando el método tradicional de PCR cuantitativa de fluorescencia con una curva estándar.

La Figura 1b muestra una trayectoria de circulación, que es una trayectoria de circulación unidireccional, relativamente concentrada y regular formada sobre la base de la convección natural y bajo el control de una barrera física. En el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido, debido al efecto físico de barrera del inserto 2 dentro del tubo de reacción, cuando el reactivo en circulación se mueve a la región inferior del tubo de reacción, solo puede pasar a través del espacio debajo del inserto 2. Y por medio del controlador de temperatura, dicha región puede mantenerse a una temperatura superior a la temperatura requerida por la reacción de desnaturalización. Por lo tanto, cuando el reactivo en circulación pasa por debajo del inserto 2 del tubo de reacción, puede producirse una reacción de desnaturalización efectiva. Además, debido al efecto físico de barrera del inserto 2 en el tubo de reacción, cuando el reactivo en circulación se mueve a la región superior del tubo de reacción, solo puede pasar a través del espacio por encima del inserto 2, y por medio del controlador de temperatura, dicha región puede mantenerse a la temperatura requerida por hibridación de cebadores específicos. Por lo tanto, cuando el reactivo en circulación pasa sobre el inserto 2 en el tubo de reacción, puede producirse una reacción de hibridación efectiva.

En referencia a las Figuras. 2a, 2b, 2c y 2d, para la práctica del método descrito anteriormente, la invención proporciona en primer lugar una realización preferida de un tubo de reacción practicable para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido, que comprende un cuerpo 1 de tubo con un extremo cerrado, dicho cuerpo 1 de tubo comprende una región 4 de depósito y una región 3 de amplificación de ácido nucleico situada debajo de la región de depósito; un inserto 2 está dispuesto en dicha región 3 de amplificación de ácido nucleico con un espacio superior que queda por encima del inserto y un espacio inferior que queda por debajo del inserto. Cuando se inyecta un reactivo en el tubo de reacción, el reactivo es capaz de moverse a lo largo de una trayectoria de circulación a través del espacio superior y el espacio inferior en el tubo de reacción bajo una fuerza interna o externa, debido a un efecto físico de barrera del inserto.

Preferiblemente, el inserto 2 se proporciona a lo largo del eje central del cuerpo 1 del tubo, y ambos lados a y b del inserto están conectados a la pared interna de la región de amplificación de ácido nucleico. Más preferiblemente, los lados a y b del inserto están conectados herméticamente a la pared interna de la región 3 de amplificación de ácido nucleico. El inserto 2 divide la región 3 de amplificación de ácido nucleico en una primera región 3-1 y una segunda región 3-2 a lo largo del eje central del cuerpo 1 del tubo, y la primera región 3-1 y la segunda región 3-2 están conectadas a través de una región 3-A superior y una región 3-B inferior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico.

Preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior d del inserto 2 y la parte inferior del cuerpo 1 del tubo (es decir, la altura de la región 3-B inferior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico) es mayor de 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que 1/2 de la altura de la región 3 de amplificación de ácido nucleico. Más preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior d del inserto 2 y la parte inferior del cuerpo 1 del tubo es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que 1/3 de la altura de la región 3 de amplificación de ácido

nucleico. Más preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior d del inserto 2 y la parte inferior del cuerpo 1 del tubo es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor o igual a 4 mm.

5 Preferiblemente, la distancia entre el extremo superior c del inserto 2 y la parte superior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico (es decir, la altura de la región 3-A superior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico) es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y es menor que la mitad de la altura de la región 3 de amplificación de ácido nucleico. Más preferiblemente, la distancia entre el extremo superior c del inserto 2 y la parte superior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que 1/3 de la altura de la región 3 de amplificación de ácido nucleico. Más preferiblemente, la distancia entre el  
10 extremo superior c del inserto 2 y la parte superior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor o igual a 3 mm.

15 Preferiblemente, el fondo del cuerpo 1 del tubo está cerrado por medio de un tapón 1-1 inferior que coopera con el cuerpo 1 del tubo. Por ejemplo, el cuerpo del tubo y el tapón inferior están conectados herméticamente entre sí mediante estructura giratoria roscada, o una estructura de bayoneta en forma de anillo, o una estructura de cierre de golpe, o por otra conexión hermética como se conoce en la técnica.

20 Preferiblemente, el cuerpo 1 del tubo comprende además una cubierta del tubo que coopera con el mismo. El cuerpo 1 del tubo y la cubierta del tubo están conectados entre sí mediante una estructura roscada giratoria, o una estructura de bayoneta en forma de anillo, o una estructura de cierre de golpe, o mediante otra conexión hermética como se conoce en la técnica.

25 Preferiblemente, la región 3 de amplificación de ácido nucleico tiene una relación de altura/diámetro interior de 3 a 12. Más preferiblemente, la región 3 de amplificación de ácido nucleico tiene una relación de altura/diámetro de 6 a 9, por ejemplo, de 7 a 8. es preferible además que la región 3 de amplificación de ácido nucleico tenga un diámetro interno de 10 mm o menos, por ejemplo 5 mm o menos, y también tenga un diámetro interno menor que el diámetro interno de la región 4 de depósito. Una estructura con dicha dimensión y relación de la invención, puede asegurar y promover eficientemente la formación espontánea de una convección continua y estable del líquido en el tubo de reacción. En la invención, la región que tiene un diámetro interno mayor en la porción superior del cuerpo 1 del tubo puede servir  
30 como la región 4 de depósito. Dado que el diámetro interno de la región 3 de amplificación de ácido nucleico es relativamente pequeño, una punta de pipeta no puede ser fácilmente insertada en el fondo, y el líquido tampoco puede fluir al fondo espontáneamente. Por lo tanto, el reactivo de reacción puede almacenarse temporalmente en la región 4 de depósito y luego el reactivo de reacción en la región 4 de depósito puede introducirse en la región 3 de amplificación de ácido nucleico mediante centrifugación, vibración u otros métodos, en los que la reacción de  
35 amplificación o la adquisición de la señal de fluorescencia se completa. Además, la región 4 de depósito tiene un diámetro mayor en relación con la región 3 de amplificación de ácido nucleico, y por lo tanto es más fácil agarrar y sostener el tubo, proporcionando una gran conveniencia para un operador en la preparación de un líquido.

40 Preferiblemente, la región 3 de amplificación de ácido nucleico tiene un volumen de 30 a 200  $\mu\text{L}$ . Más preferiblemente, la región 3 de amplificación de ácido nucleico tiene un volumen de 40 a 150  $\mu\text{L}$ .

45 Además, la cavidad interna de la región 3 de amplificación de ácido nucleico puede tener una estructura hueca cónica o una estructura hueca trapezoidal multicapa, que tiene una sección transversal con una parte superior ancha y un fondo estrecho, y amplificación de ácido nucleico, transcripción de ARN, adquisición de señal en la detección en tiempo real se realizan todas en esta región. Las ventajas de la cavidad interna con la parte superior ancha y el fondo estrecho de la región 3 de amplificación de ácido nucleico son las siguientes: cuando se produce la convección del reactivo debido a un gradiente de temperatura de arriba a abajo dentro del tubo de reacción, el reactivo puede tener una trayectoria alargada en la región con un diámetro interno más ancho en la parte superior del tubo de reacción, es decir,  
50 se puede aumentar el período de tiempo de la etapa de "extensión" en la reacción PCR, lo que puede facilitar la extensión de un fragmento largo. Por supuesto, para facilitar la fabricación, la cavidad interna de la región 3 de amplificación de ácido nucleico también puede ser una estructura hueca en columna que tiene diámetros internos superior e inferior iguales.

55 Preferiblemente, el cuerpo 1 del tubo y el inserto 2 están hechos de un material resistente al calor. Por ejemplo, el material resistente al calor se selecciona de vidrio, policarbonato (PC), polipropileno (PE), polietersulfona (PES) y polisulfona (PSF).

60 Además, es preferible que la pared interna del cuerpo 1 del tubo pueda pasivarse con albúmina de suero bovino (BSA), un agente de sililación o similar, reduciendo así la adsorción de ácido nucleico o ciertos componentes en el reactivo de reacción.

65 El tubo de reacción mencionado anteriormente puede contener: una muestra de ácido nucleico a analizar, ADN polimerasa, trifosfato de desoxiadenosina, trifosfato de desoxicitidina, trifosfato de desoxiguanosina, trifosfato de desoxitimidina, tampón de reacción, ion de magnesio divalente, aditivos de PCR como componentes no principales (por ejemplo, betaína, albúmina de suero bovino, DMSO, etc.) y al menos dos cebadores oligonucleotídicos que son específicamente complementarios a la secuencia de ácido nucleico a analizar, y opcionalmente, un tinte fluorescente o una sonda fluorescente específica capaz de unirse al ADN bicatenario. Posteriormente, para evitar la evaporación,

se usa una sustancia no volátil que tiene una baja densidad (tal como aceite de parafina o varias ceras de bajo punto de fusión) para cubrir la superficie del reactivo, o una tapa de tubo para cerrar el tubo de reacción.

Mientras tanto, la invención también proporciona un aparato de reacción para la amplificación de ácido nucleico que comprende un tubo de reacción de acuerdo con una cualquiera de la invención y uno o más controladores de temperatura capaces de proporcionar o eliminar calor, dicho controlador de temperatura se proporciona dentro o fuera del tubo de reacción. El controlador de temperatura tiene las siguientes funciones: (1) establecer un gradiente de temperatura y un gradiente de densidad para el reactivo en el tubo de reacción con base en el principio de Rayleigh-Benard, para impulsar la circulación espontánea del reactivo de reacción en el tubo de reacción; (2) controlar la temperatura del tubo de reacción y del reactivo en un sitio específico en el tubo; (3) completar la reacción en cadena de la polimerasa y otras reacciones de amplificación de ácido nucleico, a través de la circulación espontánea y el control de la temperatura del reactivo. Un controlador de temperatura capaz de establecer un gradiente de temperatura y un gradiente de densidad de un reactivo en un tubo de reacción es bien conocido en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo, en las patentes de invención CN103173434A, CN1571849A y CN101983236A.

Una realización preferida del controlador de temperatura de la invención se muestra en la Figura 3, preferiblemente, el controlador de temperatura comprende un módulo 4 de calentamiento superior y un módulo 5 de calentamiento inferior para proporcionar o eliminar calor en las partes inferior y superior del tubo de reacción, respectivamente, y mediante dicho control de temperatura, se proporciona una temperatura adecuada para la desnaturalización en la parte inferior del tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido para realizar una amplificación por PCR efectiva, a fin de garantizar que el reactivo que fluye debajo del inserto pueda experimentar una reacción de desnaturalización efectiva; y también se proporciona una temperatura adecuada para la hibridación en la parte superior del tubo de reacción para asegurar que el reactivo que fluye sobre el inserto puede experimentar una reacción de hibridación efectiva. Además, un módulo 6 con un coeficiente de transferencia de calor más bajo está dispuesto entre los módulos de calentamiento superior e inferior para envolver la región de calentamiento no directa del tubo de reacción. Como tal, esto puede evitar la interferencia causada por la exposición de la región al aire externo, y también puede evitar las diferencias en la distribución del campo de temperatura entre los diferentes tubos de reacción causadas por la diferencia en la capacidad de radiación de calor entre la posición central y la posición del borde de un módulo de múltiples canales.

Preferiblemente, el aparato comprende además un módulo para la detección en tiempo real de la señal de fluorescencia. El módulo comprende una fuente 7 de luz de excitación, un filtro 8 y un fotodetector 9, y puede realizar un escaneo de equilibrio rápido de una pluralidad de muestras en un tiempo del orden de milisegundos.

La invención no se limita al tubo de reacción y al dispositivo de detección descrito en las Figuras 2 y 3, y los cambios en el modo de calentamiento y la forma del tubo de reacción están ambos dentro del alcance de la invención.

La Figura 4 muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos a partir de una plantilla de ADN usando el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención. En la aplicación, el tubo de reacción contiene: plantilla de ADN a analizar, ADN polimerasa, trifosfato de desoxiadenosina, trifosfato de desoxicitidina, trifosfato de desoxiguanosina, trifosfato de desoxitimidina, tampón de reacción, ión de magnesio divalente, aditivos de PCR como componentes no principales (por ejemplo, betaína, albúmina de suero bovino, DMSO, etc.) y al menos dos cebadores oligonucleotídicos que son específicamente complementarios a la secuencia de ácido nucleico a analizar. Posteriormente, para evitar la evaporación, se usa una sustancia no volátil que tiene una baja densidad (tal como aceite de parafina o varias ceras de bajo punto de fusión) para cubrir la superficie del reactivo, o una tapa de tubo para cerrar el tubo de reacción. Durante la amplificación, el tubo de reacción se coloca en un dispositivo de calentamiento, y el módulo de calentamiento ubicado fuera de la parte inferior del tubo de reacción se fija en 95 °C, el módulo de calentamiento ubicado fuera de la parte superior del tubo de reacción se fija en 60 °C, y el tiempo de reacción se fija en 30 minutos. El reactivo en el tubo de reacción fluirá continuamente bajo el impulso de la diferencia de temperatura y solo pasará sobre y debajo del inserto debido al efecto físico de barrera del inserto en el tubo de reacción. Y el reactivo puede experimentar una reacción de desnaturalización cuando fluye debajo del inserto, y experimentar una reacción de hibridación cuando fluye sobre el inserto, y luego experimentar una reacción de extensión a un intervalo de temperatura para la actividad de la polimerasa. Después de la amplificación, se toman 5 µL del producto del tubo y se someten a electroforesis en gel de agarosa. El carril 1 y el carril 2 muestran resultados de amplificación de muestras positivas, y el carril 3 y el carril 4 muestran resultados de amplificación de control negativo (agua DEPC). Como se puede observar a partir de los resultados, el tubo de reacción de la invención permite la amplificación de plantillas de ADN.

La Figura 5 muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados obtenidos a partir de una plantilla de ARN usando el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención. A diferencia de la amplificación de ADN, el tubo de reacción también contiene transcriptasa inversa para la síntesis de ADNc a partir de plantillas de ARN, además de los agentes mencionados anteriormente necesarios para la amplificación de ADN. Además, los ajustes de temperatura de los módulos de calentamiento para la amplificación de ARN también son diferentes: la temperatura del módulo de calentamiento ubicado fuera del fondo del tubo de reacción se establece primero en 60 °C, se mantiene

durante 20 minutos y luego se eleva a 95 °C durante 30 minutos; la temperatura del módulo de calentamiento ubicado fuera de la parte superior del tubo de reacción se ajusta a una temperatura constante de 60 °C durante 50 minutos. De manera similar, después de la amplificación, se toman 5 µL del producto del tubo y se someten a electroforesis en gel de agarosa. El carril 1 y el carril 2 son los resultados de muestras positivas, y el carril 3 y el carril 4 son los resultados del control negativo (agua DEPC). Como se puede observar a partir del electroferograma, el tubo de reacción de la invención también permite la amplificación de plantillas de ARN.

La Figura 6 ilustra que la consistencia y la especificidad de la amplificación entre tubos pueden mejorarse usando el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención, en comparación con el método de PCR de convección anterior. La amplificación se lleva a cabo en cuatro muestras de plantilla idénticas extraídas de muestras positivas para citomegalovirus (CMV) (la concentración de ADN de CMV es  $10^3$  copias/tubo), y cuatro muestras de plantilla idénticas extraídas de muestras negativas para CMV y positivas para HBV (la concentración de ADN de HBV es  $10^6$  copias/tubo), usando los tubos de reacción capaces de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención o los tubos de reacción sin la función de control de circulación con el mismo dispositivo de calentamiento, respectivamente. Los resultados de la amplificación en el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención se muestran en la Figura 6a, y los resultados de la amplificación en el tubo de reacción sin la función de control de circulación se muestran en la Figura 6b. Los carriles 1-4 muestran los resultados de amplificación de las 4 muestras idénticas positivas para ácido nucleico de CMV, y los carriles 5-8 son los resultados de amplificación de las muestras negativas para ácido nucleico de CMV y positivas para ácido nucleico de HBV como control. Los resultados muestran que la consistencia entre los resultados detectados en el punto final de las 4 muestras positivas amplificadas en los tubos de reacción de la invención en paralelo (Figura 6a, carriles 1-4), es significativamente superior a la consistencia entre los resultados de muestras amplificadas en los tubos de reacción sin la función de control de circulación (Figura 6b, carriles 1-4), lo que indica que la consistencia de amplificación entre los tubos puede mejorarse utilizando el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención. Además, los resultados detectados en el punto final también muestran una reducción significativa de la amplificación no específica en las 4 muestras negativas amplificadas en los tubos de reacción de la invención en paralelo (Figura 6a, carriles 5-8), en comparación con las muestras amplificadas en los tubos de reacción sin la función de control de circulación (Figura 6b, carriles 5-8), lo que indica que el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención puede mejorar la especificidad de la amplificación.

La Figura 7 ilustra que la velocidad de amplificación puede mejorarse usando el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención en comparación con el método de PCR de convección anterior. La amplificación se lleva a cabo en 3 grupos durante 15 minutos, 20 minutos y 25 minutos, respectivamente. Para cada grupo, 4 muestras idénticas de ADN de CMV que tienen una concentración de  $10^3$  copias/mL, y una muestra de agua DEPC como control negativo, se amplifican en paralelo, utilizando los tubos de reacción capaces de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención o los tubos de reacción sin la función de control de circulación con el mismo dispositivo de calentamiento, respectivamente. Los resultados de amplificación obtenidos por el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención se muestran en la Figura 7a, y los resultados de amplificación obtenidos por el tubo de reacción sin la función de control de circulación se muestran en la Figura 7b. Los resultados muestran que, cuando la amplificación se realiza con el tubo de reacción de la invención, después de 20 minutos de amplificación, se puede observar una banda débil en muestras positivas, y después de 25 minutos, se puede observar una banda fuerte en muestras positivas; mientras que cuando la amplificación se realiza con el tubo de reacción sin la función de control de circulación, se puede observar una banda débil en muestras positivas hasta 25 minutos después del inicio de la reacción de amplificación. Esto demuestra que la eficiencia de amplificación puede mejorarse mediante el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención en comparación con el método de PCR de convección anterior.

La Figura 8 ilustra que la precisión de la detección cuantitativa puede mejorarse mediante el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención en comparación con el método de PCR de convección anterior. La amplificación se lleva a cabo en una muestra positiva de ADN de citomegalovirus humano (CMV) que tiene una concentración de  $10^6$  copias/tubo, una muestra positiva de ADN de CMV que tiene una concentración de  $10^5$  copias/tubo y una muestra negativa de agua DEPC, mediante el uso de los tubos de reacción capaces de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de acuerdo con la invención o los tubos de reacción sin la función de control de circulación con el mismo dispositivo de calentamiento, respectivamente. Y la detección de amplificación en tiempo real se realiza con la sonda de hidrólisis TaqMan. Los resultados muestran que, la repetibilidad de los resultados de muestras con la misma concentración obtenida por los tubos de reacción de la invención es obviamente mayor que la obtenida por los tubos de reacción sin la función de control de circulación.

### Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos (que se usan solo con fines ilustrativos y no están destinados a limitar la invención).

A menos que se especifique lo contrario, los métodos e inmunoensayos experimentales de biología molecular utilizados en la invención se llevan a cabo sustancialmente de acuerdo con los métodos descritos en J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 2a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y FM Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc., 1995; Las enzimas se utilizan en las condiciones recomendadas por los fabricantes de los productos. Los expertos en la materia entenderán que los ejemplos se usan para ilustrar la invención, pero no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica.

Ejemplo 1: Un tubo de reacción que controla una trayectoria de circulación espontánea de líquido

Como se muestra en las Figuras 2a, 2b, 2c y 2d, el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico de la invención capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido comprende un cuerpo 1 de tubo con un extremo cerrado, el cuerpo 1 del tubo comprende una región 4 de depósito y una región 3 de amplificación de ácido nucleico proporcionada debajo de la región de depósito, y un inserto 2 está dispuesto en la región 3 de amplificación de ácido nucleico con un espacio superior que permanece sobre el inserto y un espacio inferior que permanece debajo del inserto 2. Cuando se inyecta un reactivo en el tubo de reacción, el reactivo es capaz de moverse a lo largo de una trayectoria de circulación a través del espacio superior y el espacio inferior en el tubo de reacción bajo una fuerza interna o una fuerza externa, debido a un efecto físico de barrera del inserto 2.

Preferiblemente, el inserto 2 se proporciona a lo largo del eje central del cuerpo 1 del tubo, y ambos lados a y b del inserto están conectados a la pared interna de la región 3 de amplificación de ácido nucleico. El inserto 2 divide la región 3 de amplificación de ácido nucleico en una primera región 3-1 y una segunda región 3-2 a lo largo del eje central del cuerpo 1 del tubo, y la primera región 3-1 y la segunda región 3-2 están conectadas a través de una región 3-A superior y una región 3-B inferior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico.

Preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior d del inserto 2 y el fondo del cuerpo 1 del tubo (es decir, la altura de la porción 3-B inferior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico) es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que la mitad de la altura de la región 3 de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, menor que 1/3 de la altura de la región de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, menor o igual a 4 mm.

Preferiblemente, la distancia entre el extremo superior c del inserto 2 y la parte superior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico (es decir, la altura de la región 3-A superior de la región 3 de amplificación de ácido nucleico) es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que 1/2 de la altura de la región 3 de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, menor que 1/3 de la altura de la región de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, menor o igual a 3 mm.

Preferiblemente, el fondo del cuerpo 1 del tubo está cerrado por medio de un tapón 1-1 inferior que coopera con el cuerpo 1 del tubo. Preferiblemente, el cuerpo del tubo y el tapón inferior están conectados herméticamente entre sí mediante una estructura roscada giratoria, o una estructura de bayoneta en forma de anillo, o una estructura de cierre de golpe, o por otra conexión hermética como se conoce en la técnica.

Preferiblemente, la región 3 de amplificación de ácido nucleico tiene una relación de altura/diámetro interior de 3 a 12. Y más preferiblemente, la región 3 de amplificación de ácido nucleico tiene una relación de altura/diámetro interior de 6 a 9.

Preferiblemente, la región 3 de amplificación de ácido nucleico tiene un volumen de 30 a 200  $\mu\text{L}$ . Y más preferiblemente, la región 3 de amplificación de ácido nucleico tiene un volumen de 40 a 150  $\mu\text{L}$ .

Preferiblemente, la cavidad interna de la región 3 de amplificación de ácido nucleico puede ser una estructura hueca cónica o una estructura hueca trapezoidal multicapa, que tiene una sección transversal con una parte superior ancha y un fondo estrecho, o una estructura hueca columnar que tiene diámetros internos superior e inferior iguales. La amplificación de ácido nucleico, la transcripción de ARN, la adquisición de señal en la detección en tiempo real se realizan en esta región.

El cuerpo 1 del tubo y el inserto 2 están hechos de un material resistente al calor. Por ejemplo, el material resistente al calor se selecciona de vidrio, policarbonato (PC), polipropileno (PE), polietersulfona (PES) y polisulfona (PSF).

Además, se prefiere que la pared interna del cuerpo 1 del tubo pueda pasivarse con albúmina de suero bovino (BSA), un agente de sillación, etc., reduciendo así la adsorción de ácido nucleico o ciertos componentes en el reactivo de reacción.

El tubo de reacción mencionado anteriormente puede contener: una muestra de ácido nucleico a analizar, ADN polimerasa, trifosfato de desoxiadenosina, trifosfato de desoxicitidina, trifosfato de desoxiguanosina, trifosfato de desoxitimidina, tampón de reacción, ion divalente de magnesio, aditivos de PCR como componentes no principales (por ejemplo, betaína, albúmina de suero bovino, DMSO, etc.) y al menos dos cebadores oligonucleotídicos que son específicamente complementarios a la secuencia de ácido nucleico a analizar, y opcionalmente, un tinte fluorescente o una sonda fluorescente específica capaz de unirse al ADN bicatenario. Posteriormente, para evitar la evaporación,

se usa una sustancia no volátil que tiene una baja densidad (tal como aceite de parafina o varias ceras de bajo punto de fusión) para cubrir la superficie del reactivo, o una tapa de tubo para cerrar el tubo de reacción.

Ejemplo 2: Amplificación y detección de plantillas de ADN en el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido del Ejemplo 1

### 1. Materiales experimentales

Reactivos químicos: ADN polimerasa HS SpeedSTAR (TaKaRa), Tampón I rápido 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus) (TaKaRa), dNTP (TaKaRa), agua DEPC, aceite de parafina, tampón de carga de ADN 6 × (que incluye Sybr Green).

Instrumentos y materiales: un instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico (véase la solicitud CN201110456811.9); el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido del Ejemplo 1, un instrumento de electroforesis en gel, un generador de imágenes de gel (Bio-Rad).

Cebadores:

JxbUL54F1: GTGCGCCTTGACACTGTAC (SEQ ID NO.1)

JxbUL54R1 1: CGACAAGTACTTTGAGCAGG (SEQ ID NO.2)

Plantilla de prueba 1: extracto de ADN del virus CMV, y la concentración es de 10<sup>3</sup> copias/mL

Plantilla de prueba 2: agua DEPC

### 2. Método experimental:

(1) Preparación del reactivo de amplificación: dNTP 3,2 mM, 4 µL de Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus), 1 U de ADN polimerasa HS SpeedSTAR, 0,4 µL de JxbUL54F1 10 µM, 0,4 µL de JxbUL54R1 10 µM, 5 µL de plantilla de prueba; y se usa agua DEPC para completar un volumen total de 40 µL.

(2) Amplificación de ácido nucleico: a. el reactivo de amplificación preparado en (1) se inyecta en un tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico de la invención capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido, y se añaden gota a gota 10 µL de aceite de parafina y se permite que la región para la amplificación de ácido nucleico se llene con el reactivo de amplificación por centrifugación, vibración u otros medios; b. La temperatura inferior del instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico se fija en 95 °C, la temperatura superior se fija en 60 °C y el tiempo de amplificación se fija en 30 minutos. El tubo de reacción que contiene el reactivo de amplificación se introduce en el instrumento para la amplificación de ácido nucleico, y se inicia el procedimiento de amplificación, y el tubo de reacción se retira después de que se completa el procedimiento.

(3) Detección por electroforesis del producto amplificado: se toman 5 µL del producto amplificado del tubo de reacción y se mezclan con 1 µL de tampón de carga, y luego se someten a electroforesis en gel de agarosa al 3% para su detección.

3. Resultados experimentales: como se muestra en la Figura 4, el carril 1 y el carril 2 muestran resultados de amplificación de muestras positivas, y el carril 3 y el carril 4 muestran resultados de amplificación de control negativo (agua DEPC). Como se puede observar en los resultados, el tubo de reacción de la invención puede permitir la amplificación de plantillas de ADN; y no se observa una banda en el control negativo, lo que indica que no se produce una amplificación no específica.

Ejemplo 3: Amplificación y detección de plantillas de ARN en el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido del Ejemplo 1

### 1. Materiales experimentales

Reactivos químicos: ADN polimerasa HS SpeedSTAR (TaKaRa), transcriptasa inversa MMLV (Transgén), Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus) (TaKaRa), dNTP (TaKaRa), agua DEPC, aceite de parafina, tampón de carga de ADN 6x (que incluye Sybr Green)

Instrumentos y materiales: un instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico (véase la solicitud CN201110456811.9); el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido del Ejemplo 1, un instrumento de electroforesis en gel, un generador de imágenes de gel (Bio-Rad)

Cebadores:

CA16-WJ-F6-1: CAAGTAYTACCYACRGCTGCCAA (SEQ ID NO.3)

CA16-WJ-R6-1: CAACACACAYCTMGTCTCAATGAG (SEQ ID NO.4)

Plantilla de prueba 1: extracto de ARN del Coxsackievirus A16 (virus CA16), la concentración es de 10<sup>3</sup> copias/mL

Plantilla de prueba 2: agua DEPC

2. Método experimental:

(1) Preparación del reactivo de amplificación:

5 DNTP 3,2 mM, 4 µL Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus), 1 U de ADN polimerasa HS SpeedSTAR, 0,4 U MMLV, 0,4 µL de JxbUL54F1 10 µM, 0,4 µL de JxbUL54R11 10 µM, 5 µL de plantilla de prueba; y se usa agua DEPC para completar un volumen total de 40 µL.

10 (2) Amplificación de ácido nucleico: a. el reactivo de amplificación preparado en (1) se inyecta en un tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico de la invención capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido, y se añaden gota a gota 10 µL de aceite de parafina y se permite que la región para la amplificación de ácido nucleico se llene con el reactivo de amplificación por centrifugación, vibración u otros medios; b. La temperatura del módulo de calentamiento en la parte inferior del instrumento se fija en 60 °C durante 20 minutos, y luego se fija en 95 °C durante 30 minutos; la temperatura de calentamiento en la parte superior del instrumento se ajusta a una temperatura constante de 60 °C durante 50 minutos. El tubo de reacción que contiene el reactivo de amplificación se introduce en el instrumento, y se inicia el procedimiento de amplificación, y el tubo de reacción se retira después de que se completa el procedimiento.

15 (3) Detección por electroforesis del producto amplificado: se toman 5 µL del producto amplificado del tubo de reacción y se mezclan con 1 µL de tampón de carga, y luego se someten a electroforesis en gel de agarosa al 3% para su detección.

20 3. Resultados experimentales: como se muestra en la Figura 5, el carril 1 y el carril 2 muestran resultados de amplificación de muestras positivas, y el carril 3 y el carril 4 muestran resultados de amplificación de control negativo (agua DEPC). Como se puede observar en los resultados, el tubo de reacción de la invención puede permitir la amplificación de plantillas de ARN; y no se observa una banda en el control negativo, lo que indica que no se produce una amplificación no específica.

25 Ejemplo 4: Comparación de la consistencia y especificidad entre las amplificaciones en los tubos de reacción con y sin la función de control de circulación.

30 1. Materiales experimentales

35 Reactivos químicos: ADN polimerasa HS SpeedSTAR (TaKaRa), Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus) (TaKaRa), dNTP (TaKaRa), agua DEPC, aceite de parafina, tampón de carga de ADN 6 × (que contiene Sybr Green)

Instrumentos y materiales: un instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico; el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido del Ejemplo 1, un tubo de reacción sin la función de control de circulación (véase el número de solicitud 201110360350.5), un instrumento de electroforesis en gel, un generador de imágenes de gel (Bio-Rad)

40 Cebadores:

JxbUL54F1: GTGCGCCTTGACACTGTAC (SEQ ID NO.1)

JxbUL54R11: CGACAAGTACTTTGAGCAGG (SEQ ID NO.2)

45 Plantilla de prueba 1: extracto de ADN del virus CMV, y la concentración es de 10<sup>3</sup> copias/mL

Plantilla de prueba 2: agua DEPC

2. Método experimental:

50 (1) Preparación del reactivo de amplificación: dNTP 3,2 mM, 4 µL de Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus), 1 U ADN polimerasa HS SpeedSTAR, 0,4 µL de JxbUL54F1 10 µM, 0,4 µL de JxbUL54R11 10 µM, 5 µL de plantilla de prueba, y se usa agua DEPC para completar un volumen total de 40 µL.

55 (2) Amplificación de ácido nucleico: a. el reactivo de amplificación preparado en (1) se inyecta en un tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico de la invención capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido, o el tubo de reacción sin la función de control de circulación, respectivamente. Se añaden gota a gota 10 µL de aceite de parafina y se permite que la región para la amplificación de ácido nucleico se llene con el reactivo de amplificación por centrifugación, vibración u otros medios; b. la temperatura inferior del instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico se fija en 95 °C, la temperatura superior se fija en 60 °C y el tiempo de amplificación se fija en 30 minutos. Los tubos de reacción que contienen el reactivo de amplificación se introducen en el instrumento y se inicia el procedimiento de amplificación; y el tubo de reacción se saca después de que se completa el procedimiento.

60 (3) Detección por electroforesis del producto amplificado: se toman 5 µL del producto amplificado del tubo de reacción y se mezclan con 1 µL de tampón de carga, y luego se someten a electroforesis en gel de agarosa al 3% para su detección.

3. Resultados experimentales: Los carriles 1-4 en la Figura 6 muestran los resultados de amplificación de muestras positivas, en las que las bandas de las muestras amplificadas en el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaces de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de la invención (Figura 6a) tienen una intensidad significativamente más fuerte que las bandas de las muestras que se amplificaron en el tubo de reacción sin la función de controlar una trayectoria de circulación (Figura 6b). Los carriles 5-8 en la Figura 6 muestran los resultados de amplificación de muestras negativas, en los que los carriles 5-8 en la Figura 6a no muestran bandas sobre un fondo claro, lo que indica que no se produce amplificación no específica tal como el dímero cebador en las muestras amplificadas en el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido de la invención; mientras que la formación de dímeros de cebador se observa claramente en las muestras amplificadas en el tubo de reacción sin la función de control de circulación (Figura 6b). Los resultados anteriores demuestran que el tubo de reacción capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de la invención tiene la función de mejorar la consistencia y especificidad de la amplificación en diferentes tubos.

Ejemplo 5: Comparación de la eficiencia de amplificación de los tubos de reacción con y sin la función de control de circulación

#### 1. Materiales experimentales

Reactivos químicos: ADN polimerasa HS SpeedSTAR (TaKaRa), Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus) (TaKaRa), dNTP (TaKaRa), agua DEPC, aceite de parafina, tampón de carga de ADN 6 × (que contiene Sybr Green)  
Instrumentos y materiales: un instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico; el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido del Ejemplo 1, un tubo de reacción sin la función de control de circulación (véase, número de solicitud 201110360350.5), un instrumento de electroforesis en gel, un generador de imágenes de gel (Bio-Rad)  
Cebadores:

JxbUL54F1: GTGCGCCTTGACACTGTAC (SEQ ID NO.1)  
JxbUL54R1 1: CGACAAGTACTTTGAGCAGG (SEQ ID NO.2)

Plantilla de prueba 1: extracto de ADN del virus CMV, y la concentración es de 10<sup>3</sup> copias/mL  
Plantilla de prueba 2: agua DEPC

#### 2. Método experimental:

(1) Preparación del reactivo de amplificación: dNTP 3,2 mM, 4 µL de Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus), 1 U ADN polimerasa HS SpeedSTAR, 0,4 µL de JxbUL54F1 10 µM, 0,4 µL de JxbUL54R1 10 µM, 5 µL de plantilla de prueba, y se usa agua DEPC para completar un volumen total de 40 µL.

(2) Amplificación de ácido nucleico: a. el reactivo de amplificación preparado en (1) se inyecta en un tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico de la invención capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido, y el tubo de reacción sin la función de control de circulación, respectivamente. Se añaden gota a gota 10 µL de aceite de parafina y se permite que la región para la amplificación de ácido nucleico se llene con el reactivo de amplificación por centrifugación, vibración u otros medios; b. la temperatura inferior del instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico se fija en 95 °C, la temperatura superior se fija en 60 °C y el tiempo de amplificación se fija en 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos. Los tubos de reacción que contienen el reactivo de amplificación se introducen en el instrumento y se inicia el procedimiento; y el tubo de reacción se saca después de que se completa el procedimiento.

(3) Detección por electroforesis del producto amplificado: se toman 5 µL del producto amplificado del tubo de reacción y se mezclan con 1 µL de tampón de carga, y luego se someten a electroforesis en gel de agarosa al 3% para su detección.

3. Resultados experimentales: los resultados de amplificación obtenidos con el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de la invención se muestran en la Figura 7a, y los resultados de amplificación obtenidos con el tubo de reacción sin la función de control de circulación se muestran en la Figura 7b. Los resultados muestran que, cuando se realiza la amplificación con el tubo de reacción de la invención, se puede observar una banda débil en muestras positivas después de 20 minutos de amplificación, y después de 25 minutos, se puede observar una banda fuerte en muestras positivas; mientras que cuando la amplificación se realiza con el tubo de reacción sin la función de control de circulación, se puede observar una banda débil en muestras positivas hasta 25 minutos después del inicio de la amplificación. Esto demuestra que el tubo de reacción de la invención puede mejorar la eficacia de la amplificación en comparación con el método anterior de PCR por convección.

Ejemplo 6: Comparación de resultados de detección de fluorescencia en tiempo real en amplificaciones en tubos de reacción con o sin la función de control de circulación

1. Materiales experimentales

Reactivos químicos: ADN polimerasa HS SpeedSTAR (TaKaRa), Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus) (TaKaRa), dNTP (TaKaRa), agua DEPC, aceite de parafina.

Instrumentos y materiales: un instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico y la detección de fluorescencia en tiempo real (véase la solicitud número CN201110456811.9); el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido del Ejemplo 1, un tubo de reacción sin la función de control de circulación (véase, la solicitud número 201110360350.5)

Cebadores:

JxbUL54F1: GTGCGCCTTGACACTGTAC (SEQ ID NO.1)

JxbUL54R11: CGACAAGTACTTTGAGCAGG (SEQ ID NO.2)

Sonda: JxbUL54P1: FAM-AGCCGGCTCCAAGTGCAAG-BHQ-1 (SEQ ID NO.5)

Plantilla de prueba 1: plantilla de extracto de ADN del virus CMV, y la concentración es 10<sup>6</sup> copias/mL

Plantilla de prueba 2: plantilla de extracto de ADN del virus CMV, y la concentración es de 10<sup>5</sup> copias/mL

Plantilla de prueba 3: agua DEPC

2. Método experimental:

(1) Preparación del reactivo de amplificación: dNTP 3,2 mM, 4 µL de Tampón rápido I 10 × (Mg<sup>2+</sup> plus), 1 U de ADN polimerasa HS SpeedSTAR, 0,4 µL de JxbUL54F1 10 µM, 0,4 µL de JxbUL54R11 10 µM, 0,2 µL de JxbUL54P1 10 µM, 5 µL plantilla de prueba y se utiliza agua DEPC para obtener un volumen total de 40 µL.

(2) Amplificación de ácido nucleico: a. el reactivo de amplificación preparado en (1) se inyecta en un tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico de la invención capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido, y el tubo de reacción sin la función de control de circulación, respectivamente. Se añaden gota a gota 10 µL de aceite de parafina y se permite que la región para la amplificación de ácido nucleico se llene con el reactivo de amplificación por centrifugación, vibración u otros medios; b. la temperatura inferior del instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico se fija en 95 °C, la temperatura superior se fija en 60 °C y el tiempo de amplificación se fija en 30 minutos. Los tubos de reacción que contienen el reactivo de amplificación se introducen en el instrumento de fabricación casera para la amplificación de ácido nucleico y la detección de fluorescencia en tiempo real, y se inicia el procedimiento; y después de completar el procedimiento, se saca el tubo de reacción y se analizan los datos.

3. Resultados experimentales:

Los resultados de amplificación obtenidos con el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación espontánea de líquido de la invención se muestran en la Figura 8a, y los resultados de amplificación obtenidos con el tubo de reacción sin la función de control de circulación se muestran en la Figura 8b. Los resultados demuestran que, cuando la amplificación se realiza con el tubo de reacción de la invención, la repetibilidad de la curva de amplificación de muestras que tienen la misma concentración es obviamente superior al tubo de reacción sin función de control de circulación, lo que sugiere que el tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico capaz de controlar una trayectoria de circulación de líquido de la invención puede permitir la detección cuantitativa en una muestra de ácido nucleico.

Si bien se han descrito en detalle realizaciones específicas de la invención, los expertos en la materia entenderán que, de acuerdo con todas las enseñanzas que se han divulgado, se pueden realizar diversas modificaciones y sustituciones a estos detalles, que están dentro del alcance de la invención. El alcance completo de la invención viene dado por las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> XIAMEN UNIVERSITY»XIAMEN INNODX BIOTECH CO., LTD

<120> TUBO DE REACCIÓN PARA AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO CAPAZ DE CONTROLAR LA TRAYECTORIA DE CIRCULACIÓN DE LÍQUIDO

<130> IEC150041PCT

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador  
  
 <400> 1  
 gtgcgccctg acactgtac 19  
  
 10 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 2  
 cgacaagtac tttgagcagg 20  
 20  
 <210> 3  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 3  
 30 caagtaytac cyacrgctgc caa 23  
  
 <210> 4  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 40 <400> 4  
 caacacacay ctmgctcaa tgag 24  
  
 <210> 5  
 <211> 19  
 45 <212> **ADN**  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda  
 50  
 <400> 5  
 agccggctcc aagtgaag 19

## REIVINDICACIONES

1. Un tubo de reacción para la amplificación de ácido nucleico, que comprende un cuerpo (1) de tubo con un extremo cerrado, dicho cuerpo (1) de tubo comprende una región (4) de depósito y una región (3) de amplificación de ácido nucleico situada debajo de la región de depósito; en el que un inserto (2) está dispuesto en dicha región (3) de amplificación de ácido nucleico con un espacio superior que permanece sobre el inserto (2) y un espacio inferior que permanece debajo del inserto (2), en el que cuando se inyecta un reactivo en el tubo de reacción, el reactivo es capaz de moverse a lo largo de una trayectoria de circulación a través del espacio superior y el espacio inferior en el tubo de reacción bajo una fuerza interna o externa, debido a un efecto físico de barrera del inserto (2).
2. El tubo de reacción de la reivindicación 1, en el que el inserto (2) se proporciona a lo largo del eje central del cuerpo (1) del tubo, y ambos lados (a, b) del inserto están conectados a la pared interna de la región (3) de amplificación del ácido nucleico.
3. El tubo de reacción de la reivindicación 2, en el que el inserto (2) divide la región de amplificación de ácido nucleico en una primera región (3-1) y una segunda región (3-2) a lo largo del eje central del cuerpo (1) del tubo, y la primera región (3-1) y la segunda región (3-2) están conectadas a través de la región (3-A) superior y la región (3-B) inferior de la región de amplificación de ácido nucleico.
4. El tubo de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la distancia entre el extremo inferior (d) del inserto (2) y la parte inferior del cuerpo del tubo es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que la mitad de la altura de la región (3) de amplificación de ácido nucleico; preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior (d) del inserto (2) y la parte inferior del cuerpo del tubo es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que 1/3 de la altura de la región (3) de amplificación de ácido nucleico; más preferiblemente, la distancia entre el extremo inferior (d) del inserto (2) y la parte inferior del cuerpo del tubo es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor o igual a 4 mm.
5. El tubo de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la distancia entre el extremo superior (c) del inserto (2) y la parte superior de la región (3) de amplificación de ácido nucleico es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y es menor que la mitad de la altura de la región (3) de amplificación de ácido nucleico; preferiblemente, la distancia entre el extremo superior (c) del inserto (2) y la parte superior de la región (3) de amplificación de ácido nucleico es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor que 1/3 de la altura de la región (3) de amplificación de ácido nucleico; más preferiblemente, la distancia entre el extremo superior (c) del inserto (2) y la parte superior de la región (3) de amplificación de ácido nucleico es mayor que 0 mm (por ejemplo, mayor o igual a 1 mm) y menor o igual a 3 mm.
6. El tubo de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el tubo de reacción se caracteriza por uno o más de los siguientes elementos:
- (i) la parte inferior del cuerpo (1) del tubo está cerrada por medio de un tapón (1-1) inferior que coopera con el cuerpo (1) del tubo; y
- (ii) el cuerpo (1) del tubo comprende una cubierta del tubo que coopera con el mismo.
7. El tubo de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la región (3) de amplificación de ácido nucleico tiene una relación de altura/diámetro interior de 3 a 12; preferiblemente, la región (3) de amplificación de ácido nucleico tiene una relación de altura/diámetro interior de 6 a 9.
8. El tubo de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la región (3) de amplificación de ácido nucleico tiene un volumen de 30 a 200  $\mu\text{L}$ ; preferiblemente, la región de amplificación de ácido nucleico tiene un volumen de 40 a 150  $\mu\text{L}$ .
9. El tubo de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el cuerpo (1) del tubo y el inserto (2) están hechos de un material resistente al calor; por ejemplo, el material resistente al calor se selecciona de vidrio, policarbonato, polipropileno, polietersulfona y polisulfona.
10. Un aparato de reacción para la amplificación de ácido nucleico, que comprende el tubo de reacción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y uno o más controladores de temperatura capaces de proporcionar o eliminar calor, dicho controlador de control de temperatura está dispuesto fuera o dentro del tubo de reacción.
11. Un kit que comprende el tubo de reacción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
12. Un método para amplificar un ácido nucleico objetivo en una muestra, que comprende usar el tubo de reacción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o el aparato de reacción de acuerdo con la reivindicación 10; preferiblemente, el ácido nucleico es ADN o ARN; preferiblemente, la amplificación es una reacción PCR o una reacción de transcripción inversa.

13. El método de la reivindicación 12, que comprende las etapas de:

1) inyectar un reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico en el tubo de reacción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9;

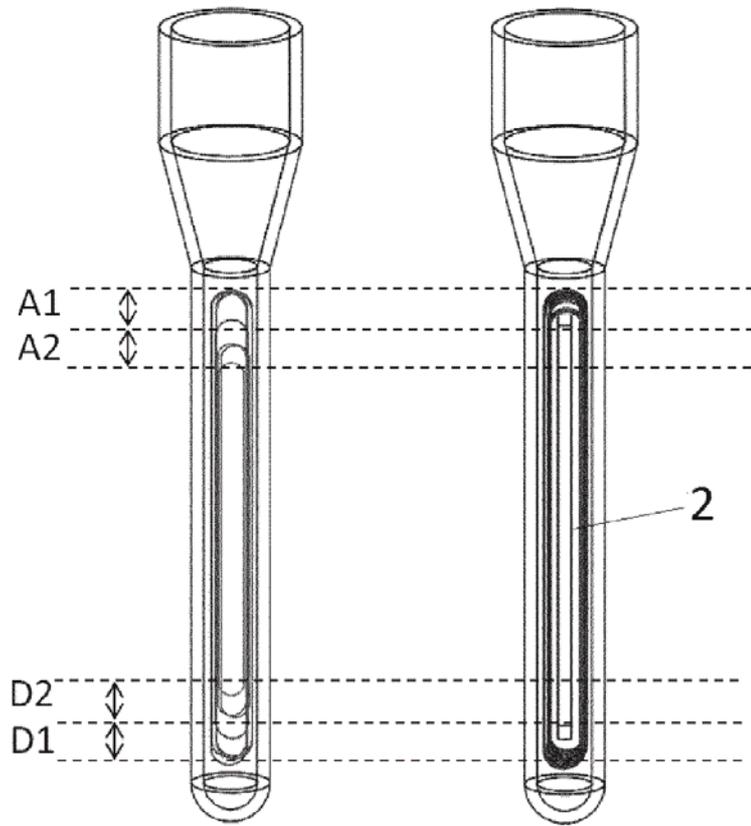
5 2) llenar el reactivo en la región (3) de amplificación de ácido nucleico mediante vibración, centrifugación u otras formas; opcionalmente, cubriendo la superficie del reactivo con una sustancia no volátil (por ejemplo, aceite de parafina o cera de bajo punto de fusión) o cerrando el tubo de reacción con una cubierta de tubo;

3) proporcionar o eliminar calor en un sitio específico del tubo de reacción mediante un controlador de temperatura para realizar una transcripción inversa de ARN y/o una reacción de amplificación de ADN;

10 4) opcionalmente, detectar el producto amplificado durante o después de la amplificación de ácido nucleico.

14. Uso del tubo de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o el aparato de reacción de la reivindicación 10 en la amplificación de ácido nucleico.

15 15. Uso del tubo de reacción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la preparación de un kit, y el kit se usa para la amplificación de ácido nucleico.



**FIG. 1a**

**FIG. 1b**

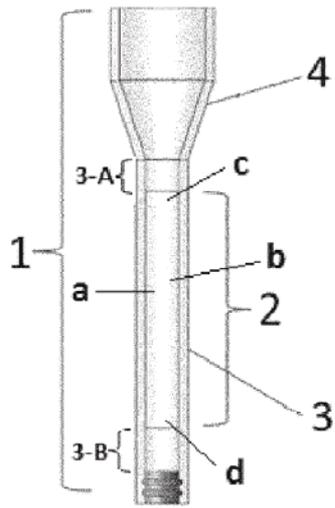


FIG. 2a

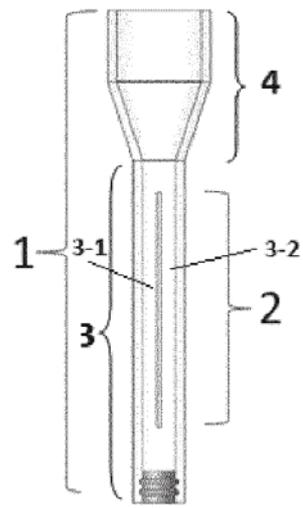


FIG. 2b

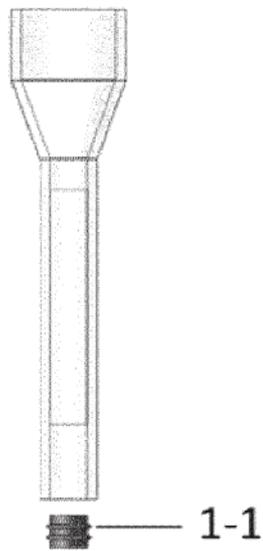


FIG. 2c

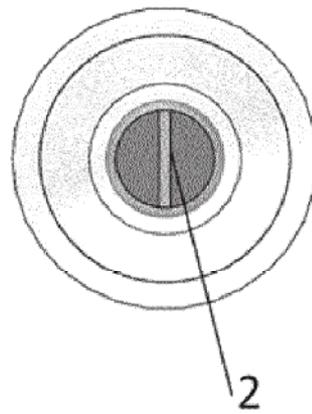
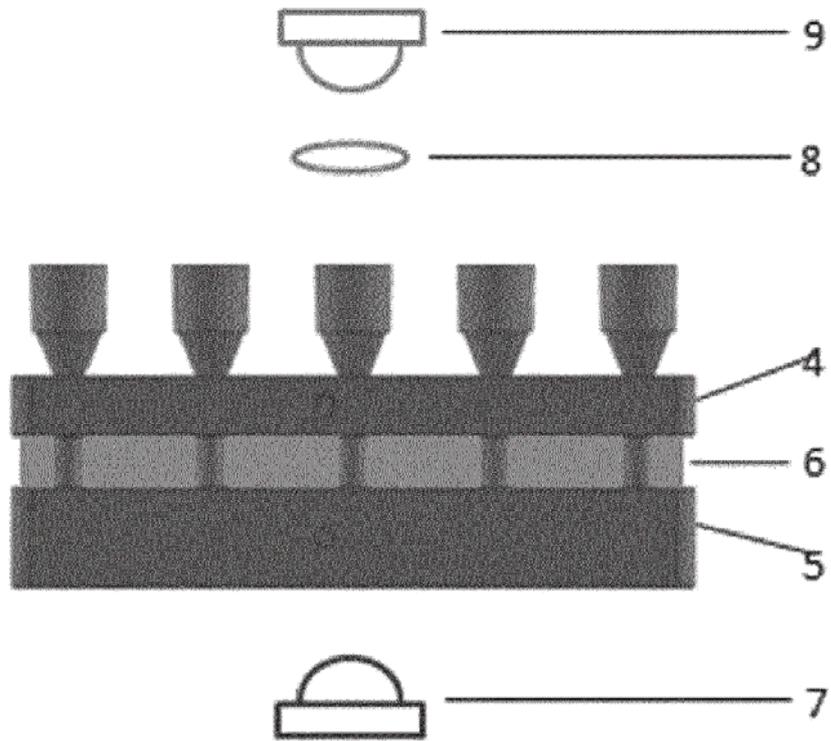
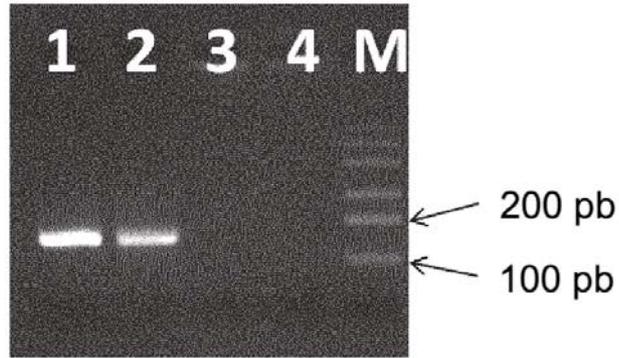


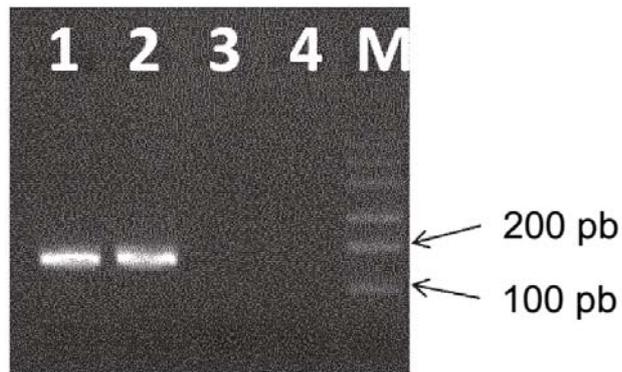
FIG. 2d



**FIG. 3**



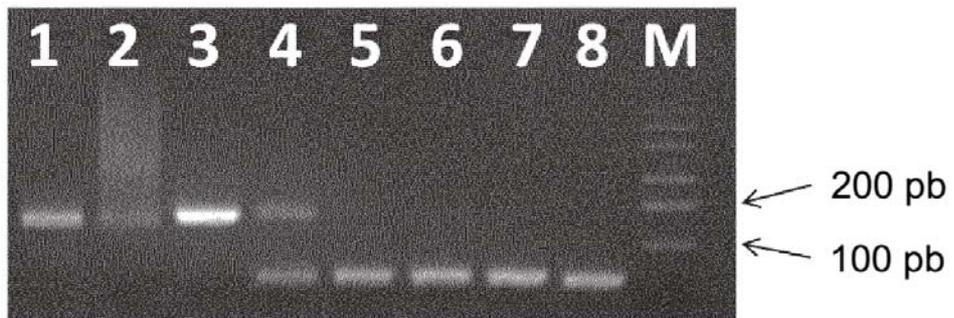
**FIG. 4**



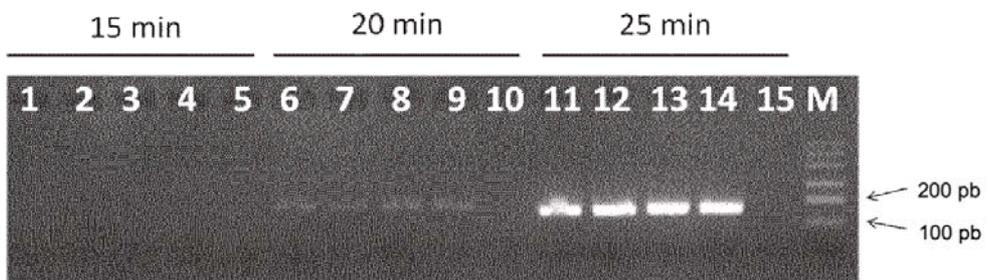
**FIG. 5**



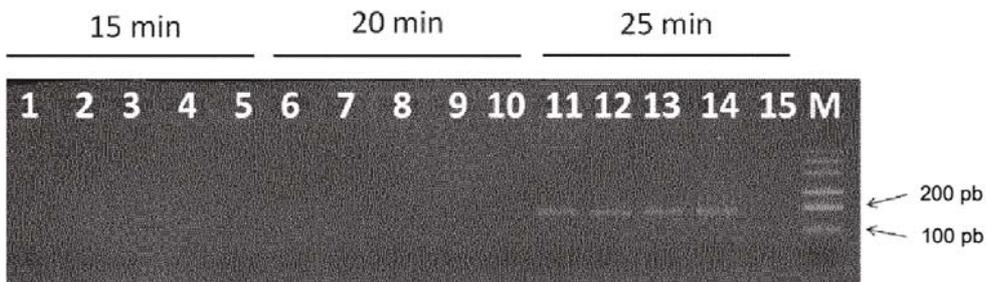
**FIG. 6a**



**FIG. 6b**

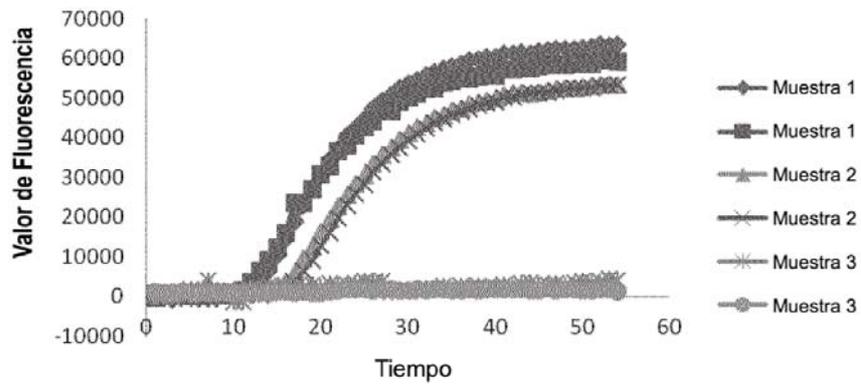


**FIG. 7a**



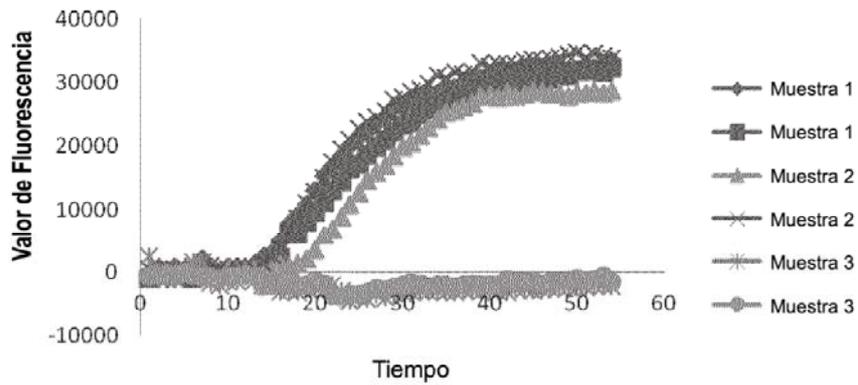
**FIG. 7b**

**Amplificación en tiempo real y detección con tubo de reacción capaz de controlar la trayectoria de circulación de líquido**



**FIG. 8a**

**Amplificación en tiempo real y detección con tubo de reacción sin la función de control de circulación**



**FIG. 8b**